

小麦淀粉品质改良的综合标记辅助选择体系的建立

梁荣奇,张义荣,姚大年,李保云,尤明山,刘广田

(中国农业大学作物学院植物遗传育种系,北京 100094)

摘要:综合运用常规育种技术和标记辅助选择,建立了细胞和个体水平(花粉和籽粒染色、直链淀粉含量、膨胀势和RVA粘度参数)、蛋白质水平(Wx蛋白的SDS-PAGE)、DNA水平(Wx基因的STS标记和SSR标记)3个水平的综合标记辅助选择体系,用于改良淀粉品质,培育优质面条小麦和糯性小麦。结果表明,利用花粉和籽粒染色、Wx蛋白电泳、Wx基因的STS标记和SSR标记可以选育糯麦;国内首次从5个组合中选育出一批糯性小麦株系。建立了依膨胀势、直链淀粉含量、高峰粘度的面条品质评分的回归方程,给出了小麦面条品质育种早代的预测指标。对综合标记辅助选择体系的利用和糯性小麦的应用进行了讨论。

关键词:标记辅助选择;直链淀粉;膨胀势;RVA;STS标记;SSR标记;糯性小麦;面条品质

Establishment of the Integrated Marker-assisted Selection System to Improving Common Wheat Starch Quality

LIANG Rong-qi, ZHANG Yi-rong, YAO Da-nian, LI Bao-yun, YOU Ming-shan, LIU Guang-tian

(College of Crop Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Integrated marker-assisted selection system in 3 levels, including cell and individual level (pollen and grain section stain, amylose contents, swelling power, RVA parameters), protein level (SDS-PAGE for Wx subunits) and DNA level (STS marker and SSR marker for Wx genes) was established for improving wheat starch quality and breeding common waxy wheat and quality-noodle wheat. The results showed that the waxy wheat lines were obtained by conventional hybridization breeding method in combination with pollen and grain section stain, SDS-PAGE, STS marker and SSR marker. The linear regression equations for noodle quality assessment score according to amylose contents, swelling power and peak viscosity were respectively established, which could be used in breeding programs. Application of the integrated marker-assisted selection system was discussed.

Key words: Marker-assisted selection; Amylose contents; Swelling power; RVA; STS marker; SSR marker; Waxy wheat; Noodle quality

淀粉合成酶(starch synthase, E.C.2.4.1.21)是淀粉合成过程中的关键酶,催化形成 α -1,4糖苷键,包括可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase, SSS)和颗粒结合淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)。其中,GBSS I负责直链淀粉的合成,亦称Wx蛋白。普通六倍体小麦(*Triticum aestivum* L., AABBDD)含有3种Wx蛋白亚基:Wx-A1、Wx-B1和Wx-D1,其控制基因分别位于7AS、4AL和7DS上^[1,2],当3种Wx蛋白全部缺失时,其胚乳直链淀粉含量几乎为0,就得到了自然界中不存在的糯性

小麦。

Nakamura^[3]用Kanto 107(缺失Wx-A1和Wx-B1)作母本,分别与Aldura(硬粒小麦)、白火麦(中国小麦地方品种,缺失Wx-D1)杂交,碘液检测F₂远胚端半籽粒、MS培养基培养至3叶期移栽温室,最后2D-SDS-PAGE鉴定,首次得到了糯性小麦。Hoshino^[4]、Yasui^[5]报道得到了糯性的普通小麦。Kiribuchi等^[6]用化学诱变剂处理Kanto 107,使其Wx-D1基因突变,选育出2个糯性普通小麦株系。Hegstad等^[7]通过六倍体小麦(缺失Wx-A1和Wx-

收稿日期:2001-02-28

基金项目:国家自然科学基金重点项目(39930110)和北京市自然科学基金资助项目(6990001)

作者简介:梁荣奇(1970-),男,山东莒县人,硕士,助研,在读博士生,主要从事小麦品质育种研究。刘广田为联系作者, Tel:010-62892569; E-mail:

liang063@263.net

BI)与硬粒栽培品种杂交,得到了糯性硬粒小麦。Zhao等^[8]得到了糯性六倍体小麦。Miura^[9]获得了3个位点共8种不同Wx组合类型的“中国春”等基因系。国内,刘广田^[10]首次报道得到糯性小麦。

尽管2D-SDS-PAGE可以区分Wx蛋白亚基^[11],但操作繁琐、难度大、效率低;Zhao和Sharp^[11]提出改良1D-SDS-PAGE来分离这3种Wx蛋白,使得电泳操作大为简化,为蛋白质电泳辅助选择育种材料提供了可能,但由于Wx-BI和Wx-DI分子量、等电点相近,分离效果不佳。Briney等^[12]比较了禾谷类作物的Wx基因及其相应的mRNA,发现其差别主要在于10个内含子,特别是第4个内含子变异显著。于是据此设计PCR引物,发现Wx-BI蛋白缺失材料不能产生440bp带,与蛋白质SDS-PAGE、膨胀势的测定结果高度一致。Shariflou等^[13]据近3'端的微卫星序列设计PCR引物,从“中国春”中扩增出204bp和265bp的2条带,并用非整倍体将之定位于小麦染色体7D和7A上。

本研究综合运用常规育种技术和标记辅助选择,建立了细胞和个体水平(花粉和籽粒染色、直链淀粉含量、膨胀势和RVA粘度参数)、蛋白质水平(Wx蛋白的SDS-PAGE)、DNA水平(Wx基因的STS标记和SSR标记)3个水平的综合标记辅助选择体系,用于改良淀粉品质,培育优质面条小麦和糯性小麦。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 田间材料 1995年在生产条件下收集41个小麦品种样品,每品种1000g籽粒,润麦48h后,用德国产Brabander小型实验制粉机制粉,并过100目筛,出粉率为60%左右。

糯性小麦高代材料(F₄和F₅代)是从1998年夏配制的组合中选育而出,糯麦株系来源见表1。每年10月份播种于中国农业大学科学园,次年2月份收获,立即人工催芽春化后移栽到昌平中国农业大学试验站。

1.1.2 STS-PCR寡聚核苷酸引物^[16]

左端引物:5' - AACCAGCAGCGCTTCAGCCT - 3';右端引物:5' - TTGAGCTGCGGAAGTC - GTC - 3'。

1.1.3 SSR寡聚核苷酸引物^[18]

左端引物:5' - CGCTCCCTGAAGAGAGAAA GAA - 3';右端引物:5' - ATAGGCACAACCCC - TAAC - 3'。

表1 糯麦株系及其来源

Table 1 The waxy wheat lines and their origins

糯麦株系 Lines	母本 Female parent	父本 Male parent
w12-5-1	江苏白火麦 Jiangsu Baihuomai	关东107 Kanto 107
w23-5-1	关东107 Kanto 107	内乡白火麦 Neixiang Baihuomai
w32-5-1	内乡白火麦 Neixiang Baihuomai	关东107 Kanto 107
w14-4-1	江苏白火麦 Jiangsu Baihuomai	IKE
w41-4-1	IKE	江苏白火麦 Jiangsu Baihuomai

1.2 方 法

1.2.1 籽粒剖面和花粉碘液染色 根据直链淀粉遇碘显蓝黑色,支链淀粉遇碘不显色(呈现碘液的颜色)的原理,干籽粒剖面用0.2%I₂-2%KI碘液染色;扬花期成熟花粉用0.067%I₂-0.67%KI碘液染色。

1.2.2 直链淀粉含量的测定 采用李锐等^[14]的微量样品直链淀粉含量的测定方法,并参照国标《直链淀粉含量测定方法》(GB8648-87)略有修改。

1.2.3 膨胀势的测定 采用McCormick的方法^[15]测定面粉的膨胀势。

1.2.4 RVA(Rapid Visco Analyzer)粘度参数的测定 用澳大利亚Newport公司的快速粘度分析仪测定。详细步骤及各项粘度参数的定义见参考文献[16]。

1.2.5 面条制作与评分 按国家内贸部《面条制作与评分标准》(SB/T10137-93)进行制作与评分。

1.2.6 Wx蛋白单向SDS-PAGE 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,参考文献[17],[18],略有改变。

1.2.7 DNA提取 DNA提取按CTAB法,略有修改。

1.2.8 Wx-B1基因的STS标记 PCR反应体系为:25μl总体积中含有1×buffer(10mmol/L Tris-HCl pH8.3,50mmol/L KCl,1.5mmol/L MgCl₂),dNTP(A.G.T.C)各200μmol/L,50ng引物,模板DNA200ng,Taq DNA聚合酶1U。

PCR反应条件为:首先94℃预变性5min;然后94℃变性1min,58℃退火1min,72℃延伸2min,共35个循环;最后72℃延伸10min。

扩增产物中加入5μl加样缓冲液,在8%非变性连续聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,缓冲体系为1×

TBE 溶液,120V 电泳 5h,银染检测。

1.2.9 Wx-A1、Wx-D1 基因的 SSR 标记 PCR 反应体系为:25 μ l 总体积中含有 1 \times buffer(10 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L Mg-Cl₂), 200 μ mol/L dNTP(A.G.T.C), 50ng 引物,模板 DNA 60~120ng, Taq DNA 聚合酶 1 U。

PCR 反应条件为:首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环;再 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 50s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

扩增产物中加入 2 μ l 加样缓冲液,在含有溴化乙锭的 2.0%琼脂糖凝胶上电泳分离,缓冲体系为 1 \times TAE 溶液,120V 电泳 45 min,紫外灯下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 糯性小麦的标记辅助选择体系

2.1.1 籽粒剖面和花粉染色 将扬花期的成熟花粉用 0.067% I₂-0.67% KI 碘液染色,糯性小麦的花粉呈棕红色,而其非糯性的亲本内乡白火麦花粉呈蓝黑色(图版-A)。将籽粒剖面用 0.2% I₂-2% KI 碘液染色,糯性小麦籽粒呈现棕红色;其亲本内乡白火麦和关东 107 的籽粒呈蓝黑色,而且内乡白火麦比关东 107 颜色要黑,如图版-B 所示。

籽粒剖面和花粉染色的结果说明,糯性小麦的花粉和籽粒的淀粉粒中不含有直链淀粉,因而表现为棕红色;其亲本花粉和籽粒的淀粉粒中含有直链淀粉,表现为黑色。由于 Wx-B1 剂量效应在 3 种 Wx 蛋白亚基中最大,因此关东 107(缺失 Wx-A1 和 Wx-B1)籽粒剖面染色要比内乡白火麦(Wx-D1)深。

2.1.2 Wx 蛋白 SDS-PAGE 从图版-C 中看出, Kar-

to 107 和 IKE 含有 Wx-B1 亚基,缺少分子量最大的 Wx-A1 亚基和分子量最小的 Wx-B1 亚基,江苏白火麦和内乡白火麦有 Wx-A1 和 Wx-B1 亚基,缺少 Wx-D1 亚基,而糯性小麦株系(泳道 1~5)没有带出现,说明糯性小麦的胚乳中检测不到 Wx 蛋白。另外, satanta 缺失 Wx-B1, sturdy 和荷兰小麦缺少 Wx-A1 亚基,“中国春”3 个亚基一个也不缺。

2.1.3 Wx-B1 基因的 STS 标记和 Wx-A1、Wx-D1 基因的 SSR 标记 利用 Wx-B1 基因的 STS 标记、Wx-A1 和 Wx-D1 基因的 SSR 标记对 5 个糯性小麦株系进行检测(图版-D a, b),全部没有目标带出现,说明 5 个糯性小麦株系均缺失 Wx-B1、Wx-A1 和 Wx-D1 基因,为糯性类型。

2.2 优质面条小麦的标记辅助选择体系

2.2.1 直链淀粉含量、膨胀势和 RVA 粘度性状与面条品质的关系 从图 1.2 可知,41 个小麦品种的相关分析表明,直链淀粉含量与面条评分间极显著负相关,相关系数为 -0.5322;膨胀势及其面条品质之间极显著正相关,相关系数达到 0.8016;高峰粘度与面条评分间极显著正相关,相关系数达到 0.877。说明直链淀粉含量、膨胀势和 RVA 高峰粘度在一定程度上反映面条品质。分别依直链淀粉含量、膨胀势和 RVA 高峰粘度进行回归分析,回归方程如下:

面条评分(NS) = 162.062 - 3.752 \times 直链淀粉含量(AC);

面条评分(NS) = 42.859 + 2.776 \times 膨胀势(SP);

面条评分(NS) = 52.713 + 0.138 \times 高峰粘度(PV)。

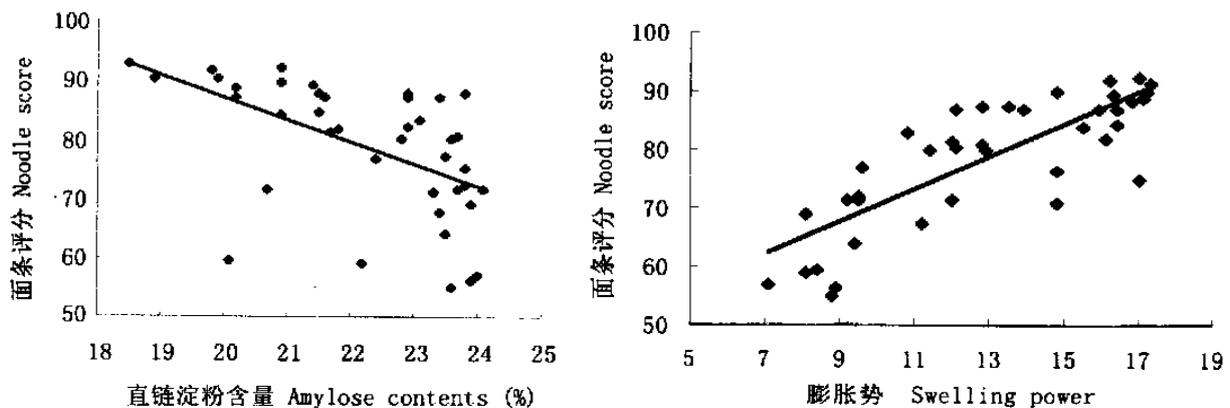


图 1 面条评分与直链淀粉含量、膨胀势散点相关分布、回归直线图

Fig.1 Divergence distribution and regression lines of noodle score and amylose content, swelling power

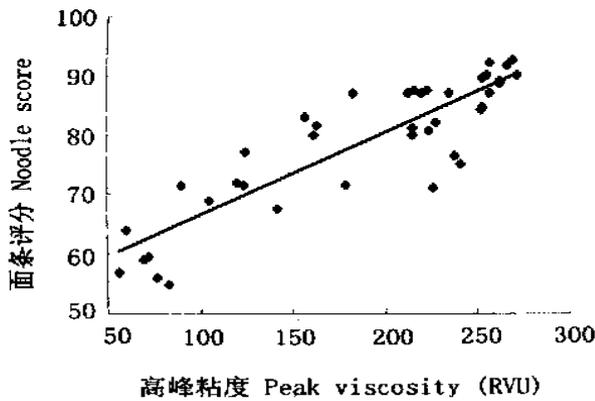


图 2 面条评分与高峰粘度相关散点分布和回归直线图

Fig. 2 Divergence distribution and regression line of noodle score and peak viscosity

根据这 3 个回归方程,计算出了相应面条评分的面粉直链淀粉含量、膨胀势和 RVA 高峰粘度的标准(表 2)。

表 2 相应面条评分的面粉直链淀粉含量、膨胀势和高峰粘度

Table 2 Values of flour amylose contents, swelling power and peak viscosity via noodle score

面条评分 Noodle score	直链淀粉含量 Amylose content (%)	膨胀势 Swelling power	高峰粘度 Peak viscosity (RVU)
90	19.21	16.97	270.20
85	20.54	15.16	233.89
75	23.20	11.58	161.45
65	25.87	7.96	98.04

2.2.2 Wx 蛋白亚基的 SDS-PAGE 和 Wx-B1 基因的 STS 标记 由于 Wx-B1 亚基(基因)缺失型小麦具有优良的面条品质,因此利用 Wx 蛋白亚基的蛋白质电泳、Wx-B1 的 STS 标记来筛选材料。其试验方法与糯性小麦是一致的。

3 讨论

3.1 综合标记辅助选择在糯麦育种中的应用

在糯性小麦育种过程中,作者采用籽粒剖面染色对一部分 F₂ 籽粒进行了检测,将近胚端种植,在扬花期花粉染色对之确认;并用花粉染色对未籽粒检测的 F₂ 植株进行了筛选。籽粒剖面染色只能鉴别糯性与非糯性籽粒,且须手工剖开小麦干籽粒,费时费力;花粉染色能鉴定糯性植株、非糯性植株和分

离株,但受到季节的限制。

利用 Wx 蛋白电泳筛选和鉴定是比较经典的方法,可以对 3 种 Wx 蛋白亚基进行区分,但破坏种子(远胚端作蛋白质电泳,近胚端要种植),使得成活率降低,而且不能区分显性纯合籽粒和杂合籽粒,还由于 Wx-D1 和 Wx-B1 分子量、迁移率相近,难以区分,使得该法在大量筛选和检测分离后代时受到限制。使用 Wx 基因的分子标记具有较大的优越性,在小麦整个发育时期任何部位都可以取材检测,而且进行 PCR 时对 DNA 的纯度要求不高,具有较高的实用性,更重要的是,这 2 个分子标记的引物据 Wx 基因本身设计,PCR 扩增产物是 Wx 基因的片段,不存在分子标记与目标基因连锁互换的问题,为分子标记辅助选择培育糯性小麦打开了方便之门。

获得糯性小麦最常用的方法是采用两种互补型“半糯性亲本”(如 IKE 缺失 Wx-A1 和 Wx-B1 亚基,江苏白火麦缺失 Wx-D1 亚基)人工杂交,对分离世代个体进行标记选择;但是关键亲本江苏白火麦和内乡白火麦(目前,只有 baihuomai^[31]、江苏白火麦和内乡白火麦缺失 Wx-D1 蛋白亚基^[14])抗寒性差,农艺性状欠佳,尤其株高过高(一般 100cm 以上)、穗下节过长(一般 35cm 左右),容易倒伏,产量不高,获得的糯性小麦因农艺性状差而难以推广种植。为此,作者采用了 2 种改良方案。方案一是直接改良糯性小麦,通过与农艺性状优良、株高矮的品种杂交,自交一代检测,将选出的糯性个体继续与轮回亲本杂交;方案二是通过连续回交首先改良江苏白火麦和内乡白火麦,为糯性小麦提供育种材料。在改良过程中,应用综合标记辅助选择体系从回交后代中筛选目的单株,将各种标记相互印证,互为补充,可以提高对优质亚基(基因)和优良品质性状的选择精度和效率。

3.2 糯性小麦的用途

(1) 直链淀粉含量的降低能提高亚洲面条的品质,直链淀粉含量低在某种程度上改变了与食用品质相关的淀粉膨胀势和粘度特性。缺失 Wx 蛋白会导致直链淀粉含量降低^[16],对淀粉的组成和品质有重要影响。一般认为直链淀粉含量低、高峰粘度高、膨胀势高的小麦面粉适于制做优质面条。日本由于缺乏优质面条粉,每年从澳大利亚进口 120 万 t,因而日本加紧了培育低含量直链淀粉品种的研究;并把糯性小麦(直链淀粉含量接近零)列为 1997 年十大农业科技之首。(2) 低含量直链淀粉品种不易穗

发芽,避免了收获前的产量损失,还能避免加工过程中 α -淀粉酶升高造成的面粉质量下降(α -淀粉酶降解直链淀粉; β -淀粉酶主要降解支链淀粉,但也能降解直链淀粉)。(3)糯性小麦的面粉可用于配粉,以降低直链淀粉的百分比,提高面条的食用品质,延长速冻食品的货架寿命。(4)糯性小麦的面粉可制作粘糕类特色食品、糯米纸类食品包装纸。(5)优质淀粉可用作纸张、浓缩剂、浆糊和环保塑料等的添加成分。因此,培育优质面条小麦,糯性小麦对我国的食品业和非食品业具有重要意义。

3.3 综合标记辅助选择体系在面条品质育种中的应用

测量直链淀粉含量、膨胀势和 RVA 高峰粘度需要单株小麦的籽粒,故而属于植株水平的选择标记。本文给出了它们的回归方程和这 3 个性状作为面条品质育种的选择指标,得以方便地应用于选育过程。在品种筛选、亲本选配和高代品系鉴定上也可广泛应用。然而,这 3 种方法都需要几克乃至十几克种子,且不能判定 Wx 蛋白(基因)缺失类型。Wx 蛋白电泳、Wx-B1 基因的 STS 分子标记,不仅能克服这些缺点,而且在亲本选配,尤其在育种早代的分离群体、回交群体中选择个体时,采用半籽粒鉴定、苗期筛选,可以替代后裔鉴定、测交,具有巨大的优越性。

References :

- [1] Nakamura T, et al. Identification of three Wx proteins in wheat. *Biochemical*, 1993, 31 :75 - 86 .
- [2] Yamamori M, et al. Wx protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1994, 89 : 179 - 184 .
- [3] Nakamura T, et al. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Gen. Genet.* 1995, 248 :253 - 259 .
- [4] Hoshino T, et al. Development of waxy common wheat by haploid breeding. *Breeding Sci.* 1996, 46(2) : 185 - 188 .
- [5] Yasui T, et al. Waxy endosperm mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their starch properties. *Breeding Sci.* 1997, 47 : 161 - 163 .
- [6] Kiribuchi O C, et al. Production of hexaploid wheats with waxy endosperm character. *Cereal Chem.* 1997, 74(1) : 72 - 74 .
- [7] Hegstad J B, et al. Development of waxy (low amylose) drum cultivars. *Ninth International Wheat Genetics Symposium*, 1998, 8(8) : 172 - 174 .
- [8] Zhao X Z, et al. Developing waxy wheat cultivars: Wx null alleles and molecular markers. *Ninth International Wheat Genetics Symposium*, 1998, 1(8) : 254 - 256 .
- [9] Mura H, et al. Production of Wx-protein deficient lines in wheat cv. Chinese Spring. *Ninth International Wheat Genetics Symposium*, 1998, 4(8) : 208 - 210 .
- [10] Liu G T, et al. Breeding common wheat with waxy endosperm. *J. of Agricultural Biotechnology*, 2000, 8(1) : 6 . (in Chinese) 刘广田,等.糯性胚乳小麦的选育. *农业生物技术学报*, 2000, 8(1) :6
- [11] Zhao X C, et al. An improved 1 D SDS-PAGE method for the identification of three waxy bread wheat waxy protein. *J. of Cereal Sci.* 1996, 23 : 191 - 193 .
- [12] Ann Briney, et al. A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat. *Molecular Breeding*, 1998, 4 : 427 - 433 .
- [13] Shariflou M R, et al. A polymorphic microsatellite in the 3' end of ' waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breeding*, 1999, 118 :275 - 277 .
- [14] Li R, et al. The amylose content mensuration method for single rice grain. *Scientia Agricultura Guangdong*, 1988, 5 : 7 - 9 . (in Chinese) 李 锐,等.水稻单粒直链淀粉含量的测定方法. *广东农业科学*, 1988, 5 :7 - 9 .
- [15] McCormick K M, et al. A swelling power test for selecting potential noodle quality in wheat. *Australian J. of Agri. Research*, 1991, 42 : 317 - 323 .
- [16] Yao D N, et al. Studies on the paste viscosity traits and their relationships with noodle quality in wheat flour. *J. of China Agricultural University*, 1997, 2(3) : 52, 68 . (in Chinese) 姚大年,等.小麦品种面粉粘度性状及其与面条品质的相关性研究. *中国农业大学学报*, 1997, 2(3) : 52, 68 .
- [17] Yao D N, et al. Identification and screen of waxy protein in wheat. *J. of Agricultural Biotechnology*, 2000, 7(1) :1 - 9 . (in Chinese) 姚大年,等.小麦品种 Waxy 蛋白的鉴定和筛选. *农业生物技术学报*, 1999, 7(1) :1 - 9 .
- [18] Wang Z N, et al. SDS-PAGE for the detection of Wx protein in polyploid wheat. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(3) : 169 - 171 . (in Chinese) 王子宁,等.多倍体麦类作物 Wx 蛋白检测的 SDS-PAGE 方法. *遗传*, 2000, 22(3) :169 - 171 .